

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 00/1945



REC'D 02 AUG 2000	
WIPO	PCT

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 27 051.1

**Anmeldetag:** 14. Juni 1999

**Anmelder/Inhaber:** November AG Novus Medicatus  
Bertling Gesellschaft für Molekulare  
Medizin, Erlangen/DE

**Bezeichnung:** Verfahren und Vorrichtung zur Identifi-  
zierung einer Nukleotidsequenz

**IPC:** C 12 Q, C 12 M

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. Juli 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Hiebinger



1

# Verfahren und Vorrichtung zur Identifizierung einer Nukleotidsequenz

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Identifizierung einer an einer elektromagnetische Wellen reflektierenden ersten Phase gebundenen ersten Nukleotidsequenz.
- 10 Aus der WO 98/48275 ist ein optischer Sensor bekannt, mit dem Nukleinsäuren, Proteine und deren Liganden erfaßt werden können.
- 15 Zum Nachweis wird der optische Sensor z.B. in eine nukleinsäureenthaltende Lösung getaucht. Nach Spülen und Trocknen des Sensors kann dessen optische Eigenschaft ermittelt werden. - Das Verfahren unter Verwendung des bekannten Sensors erfordert mehrere Schritte; es ist zeitaufwendig.
- 20 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile des Stands der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung angegeben werden, mit denen biochemische Moleküle schnell und einfach nachgewiesen werden können.
- 25 Weiteres Ziel der Erfindung ist es, eine Möglichkeit zu schaffen, mit der an feste Oberflächen gebundene biochemische Moleküle nachweisbar sind.
- 30 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 9 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 - 8 und 10 - 18.
- 35 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung einer an einer elektromagnetische Wellen reflektierenden ersten Phase gebundenen ersten Nukleotidsequenz mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Inkontaktbringen der ersten Nukleotidsequenz mit einer zweiten Nukleotidsequenz, die über metallische Cluster an eine feste für elektromagnetische Wellen durchlässige zweite Phase gebunden ist,

b) Durchstrahlen der zweiten Phase mit elektromagnetischen Wellen und

c) Erfassen der Änderung der Eigenschaften der reflektierten elektromagnetischen Wellen in bezug zu den eingestrahltten elektromagnetischen Wellen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren muß das nachzuweisende biochemische Molekül nicht unbedingt in Lösung vorliegen. Es eröffnet neue Anwendungsgebiete, z.B. die Bereitstellung fälschungssicherer Markierungen in der Identifikations- und Codierungstechnik. Das biochemische Molekül kann zu Markierungszwecken an eine feste Oberfläche, z.B. eine Banknote, Scheckkarte und dergleichen gebunden sein. Durch einfaches Inkontaktbringen der zweiten für elektromagnetische Wellen durchlässigen Phase und Messung der optischen Eigenschaften des reflektierten Lichts kann sofort ermittelt werden, ob das nachzuweisende Biomolekül an der ersten festen Phase gebunden ist. Das Verfahren ist schnell und einfach durchführbar.

Vorteilhafterweise wird als elektromagnetische Wellen monochromatisches Licht, vorzugsweise LASER, verwendet. Das ermöglicht eine einfache Erfassung der Änderung der Eigenschaften des reflektierten Lichts.

Als Änderung der Eigenschaft kann die Absorption in einem vorgegebenen Spektrum vor und/oder nach dem Inkontaktbringen der ersten und der zweiten Nukleotidsequenz gemessen werden. Ferner kann bei Verwendung von monochomatischem Licht als

Änderung der optischen Eigenschaft mindestens eine spektrale Verschiebung gemessen werden. Ferner kann als Änderung der Eigenschaft die zeitliche Änderung der Absorption und/oder Reflexion und/oder spektralen Verschiebung beim Inkontaktbringen und/oder Trennen der ersten und zweiten Nukleotidsequenz gemessen werden. Die Änderung der Eigenschaft kann unter mehreren voneinander verschiedenen Einfallswinkeln gemessen werden. Es ist denkbar, auch andere Änderungen der Eigenschaften des reflektierten Lichts zu messen. Die Wahl, welche Änderung erfaßt wird, richtet sich nach den jeweiligen Gegebenheiten.

Als erste und/oder zweite Nukleotidsequenz wird zweckmäßigerweise DNA, RNA, Protein, Peptid, Peptidnukleinsäure (PNA) oder ein Ligand davon verwendet. Grundsätzlich eignen sich alle biochemischen Moleküle mit affinen Wechselwirkungen.

Die zweite Nukleotidsequenz kann in einem ersten Feld und mindestens eine weitere Nukleotidsequenz in einem benachbarten zweiten Feld über die Cluster an die zweite Phase gebunden sein und die zweite sowie die weitere Nukleotidsequenz können mit der ersten Nukleotidsequenz in Kontakt gebracht werden. Das ermöglicht es, gleichzeitig eine Mehrzahl an Identifizierungsversuchen an einer Probe durchzuführen.

Erfindungsgemäß ist bei einer Vorrichtung zur Identifizierung einer an einer elektromagnetischen Wellen reflektierenden ersten Phase gebundenen ersten Nukleotidsequenz vorgesehen, daß eine zweite für elektromagnetische Wellen durchlässige Phase an einer Oberfläche eine über metallische Cluster gebundene zweite Nukleotidsequenz aufweist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt eine schnelle und einfache Identifizierung einer ersten Nukleotidsequenz. Ein

4

Spülen und Trocknen der Vorrichtung ist zur Messung der optischen Eigenschaften der verwendeten elektromagnetischen Wellen nicht erforderlich.

- 5 Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die metallischen Cluster aus Silber, Gold, Aluminium, Kupfer oder Indium zu bilden. An solche Metalle können chemisch modifizierte Nukleotide besonders gut gebunden werden.
- 10 Als elektromagnetische Wellen kann monochomatisches Licht, vorzugsweise LASER, verwendet werden. Vorteilhafterweise ist die zweite Phase aus Glas hergestellt. Die erste und/oder zweite Nukleotidsequenz kann DNA, RNA, Protein, Peptid, Peptidnukleionsäure oder ein Ligand davon sein. Als
- 15 Nukleotidsequenz können aber auch ss-DNA, ss-RNA oder synthetische Analoga davon verwendet werden.

- Als weiterer Bestandteil der Vorrichtung kann eine Einrichtung zur Bestimmung der Eigenschaften des
- 20 reflektierten Lichts vorgesehen sein. Mittels der Einrichtung kann die Absorption in einem vorgegebenen Spektrum vor und/oder nach dem Inkontaktbringen der ersten und der zweiten Nukleotidsequenz meßbar sein. Ferner kann mittels der Einrichtung die spektrale Verschiebung des reflektierten
  - 25 Lichts meßbar sein. Außerdem kann auch eine zeitliche Änderung der optischen Eigenschaften zur Identifikation erfaßt werden.

- Zweckmäßigerweise ist mittels der Einrichtung die optische
- 30 Eigenschaft unter mehreren voneinander verschiedenen Einfallswinkeln meßbar.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

35

Fig. 1 eine schematische Ansicht der Vorrichtung ,

Fig. 2 die Vorrichtung nach Fig. 1 im nichthybridisierten Fall und

5 Fig. 3 die Vorrichtung nach Fig. 1 im hybridisierten Fall.

In den Fig. 1 - 3 ist eine erste feste Phase beispielsweise aus einem Glasträger 1 hergestellt. Auf einer Oberfläche des Glasträgers 1 befinden sich metallische Cluster 2, z.B. Goldcluster. An die Cluster 2 gebunden ist als erste Nukleotidsequenz eine einzelsträngige DNA. Als zweite Nukleotidsequenz ist eine weitere einzelsträngige DNA 4 an eine Metallfolie 5 gebunden. Die Metallfolie 5 kann wiederum beispielsweise zu Markierungszwecken an Banknoten angebracht sein (hier nicht dargestellt).

Sofern die DNA 3 und die weitere DNA 4 in Kontakt gebracht werden, sind zwei Fälle zu unterscheiden:

20 Im ersten in Fig. 2 gezeigten Fall ist die DNA 3 nicht komplementär zur weiteren DNA 4. Es findet keine Hybridisierung statt. Zwischen der durch die Cluster 2 gebildeten Schicht und der Metallfolie 5 stellt sich ein erster Abstand  $d_1$  ein.

25 Im zweiten in Fig. 3 gezeigten Fall ist die DNA 3 komplementär zur weiteren DNA 4. Die DNA 3 und die weitere DNA 4 hybridisieren. Es stellt sich ein kleiner zweiter Abstand  $d_2$  zwischen der durch die Cluster 2 gebildeten Schicht und der Metallfolie 5 ein.

35 Ein durch den Glasträger 1 einfallender Laserstrahl (hier nicht dargestellt) wird an der durch die Cluster 2 gebildeten Schicht reflektiert. Die Eigenschaften des reflektierten Lichts hängen vom Abstand  $d_1$ ,  $d_2$  zwischen der durch die Cluster 2 gebildeten Schicht und der Metallfolie 5 ab. Mit

6

dem Abstand ändert sich beispielsweise die Absorption. Durch Messung der Absorption kann auf einfache Weise ermittelt werden, ob eine Hybridisierung vorliegt oder nicht. Das ermöglicht die Identifizierung der ersten Nukleotidsequenz.

5

Zur Herstellung der mit den Bezugszeichen 1 - 3 bezeichneten optischen Sonde wird ein Glassubstrat mit Gold bedampft, so daß Goldcluster auf der Oberfläche gebildet werden. Die DNA, z.B. Oligonukleotide, werden an ihrem 5 -Ende mit einer Thiolgruppe versehen. Die mit Gold bedampfte Glasoberfläche wird in eine die vorgenannten Oligonukleotide enthaltende Lösung getaucht. Dabei lagern sich die Oligonukleotide über eine Thiolbindung an die Goldcluster an.

15 Die mit den Bezugszeichen 4 und 5 bezeichnete Probe wird auf analoge Weise hergestellt.

Im Hinblick auf weitere Einzelheiten, insbesondere die Größe der Cluster sowie die Abstandsparameter, wird auf die WO 98/48275 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hiermit einbezogen wird.

20

# Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung einer an einer elektromagnetische Wellen reflektierenden ersten Phase (5) gebundenen ersten Nukleotidsequenz (4) mit folgenden Schritten:
  - a) Inkontaktbringen der ersten Nukleotidsequenz (4) mit einer zweiten Nukleotidsequenz (3), die über metallische Cluster (2) an eine feste für elektromagnetische Wellen durchlässige zweite Phase (1) gebundenen ist,
  - b) Durchstrahlen der zweiten Phase (1) mit elektromagnetischen Wellen und
  - c) Erfassen der Änderung der Eigenschaften der reflektierten elektromagnetischen Wellen in bezug zu den eingestrahlten elektromagnetischen Wellen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als elektromagnetische Wellen monochromatisches Licht, vorzugsweise LASER, verwendet wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Änderung der Eigenschaft die Absorption in einem vorgegebenen Spektrum vor und/oder nach dem Inkontaktbringen der ersten (4) und der zweiten Nukleotidsequenz (3) gemessen wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Verwendung von monochomatischem Licht als Änderung der Eigenschaft mindestens eine spektrale Verschiebung gemessen wird.



8

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei als Änderung der optischen Eigenschaft die zeitliche Änderung der Absorption und/oder Reflexion und/oder spektralen Verschiebung beim Inkontaktbringen und/oder Trennen der ersten (4) und zweiten Nukleotidsequenz (3) gemessen wird.  
5
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Änderung der Eigenschaft unter mehreren voneinander verschiedenen Einfallswinkeln gemessen wird.  
10
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als erste (4) und/oder zweite Nukleotidsequenz (3) DNA, RNA, Protein, Peptide, Peptidnukleinsäure (PNA) oder ein Ligand davon verwendet wird/werden.  
15
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweite Nukleotidsequenz (3) in einem ersten Feld und mindestens eine weitere Nukleotidsequenz (2) in einem benachbarten zweiten Feld über die Cluster (2) an die zweite Phase (1) gebunden sind und die zweite (3) sowie die weitere mit der ersten Nukleotidsequenz (4) in Kontakt gebracht wird.  
20
9. Vorrichtung zur Identifizierung einer an einer elektromagnetische Wellen reflektierenden ersten Phase (5) gebundenen ersten Nukleotidsequenz (4), **dadurch gekennzeichnet**, dass eine zweite für elektromagnetische Wellen durchlässige Phase (1) an einer Oberfläche eine über metallische Cluster (2) gebundene zweite Nukleotidsequenz (3) aufweist.  
25  
30
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, wobei die metallischen Cluster (2) aus Silber, Gold, Aluminium, Kupfer oder Indium gebildet sind.  
35

9

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, wobei als elektromagnetische Wellen monochromatisches Licht, vorzugsweise LASER, verwendet wird.
- 5 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die zweite Phase (1) aus Glas hergestellt ist.
- 10 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei erste (4) und/oder zweite Nukleotidsequenz (3) DNA, RNA, Protein, Peptid, Peptidnukleinsäure (PNA) oder ein Ligand davon ist.
- 15 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei als erste (4) und/oder zweite Nukleotidsequenz (3) ss-DNA, ss-RNA oder synthetische Analoga davon verwendet wird/werden.
- 20 15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei eine Einrichtung zur Bestimmung der Eigenschaft des reflektierten Lichts vorgesehen ist.
- 25 16. Vorrichtung nach Anspruch 15, wobei mittels der Einrichtung die Absorption in einem vorgegebenen Spektrum vor und/oder nach dem Inkontaktbringen der ersten (4) und der zweiten Nukleotidsequenz (3) meßbar ist.
- 30 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 oder 16, wobei mittels der Einrichtung die spektrale Verschiebung des reflektierten Lichts meßbar ist.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei mittels der Einrichtung die optischen Eigenschaften unter mehreren voneinander verschiedenen Einfallswinkeln meßbar sind.

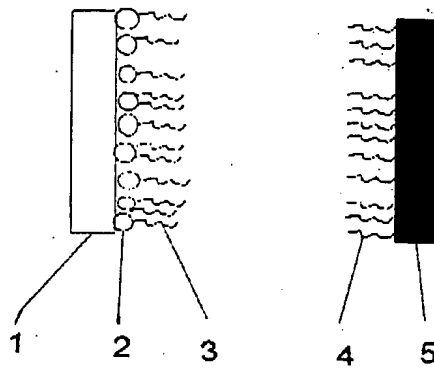


Fig. 1

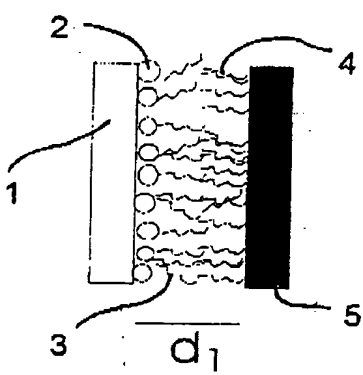


Fig. 2

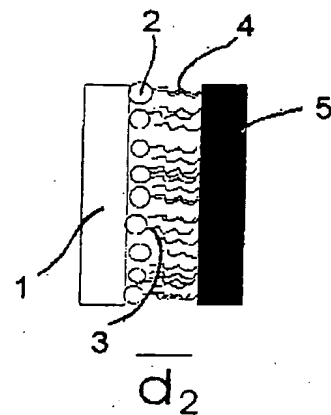


Fig. 3

10

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer an einer elektromagnetische Wellen reflektierenden ersten Phase 5 gebundenen ersten Nukleotidsequenz 4 mit folgenden Schritten:

- 10 a) Inkontaktbringen der ersten Nukleotidsequenz 4 mit einer zweiten Nukleotidsequenz 3, die über metallische Cluster 2 an eine feste für elektromagnetische Wellen durchlässige zweite Phase 1 gebundenen ist,
- 15 b) Durchstrahlen der zweiten Phase 1 mit elektromagnetischen Wellen und
- c) Erfassen der Änderung der Eigenschaften der reflektierten elektromagnetischen Wellen in bezug zu den eingestrahlten elektromagnetischen Wellen.

20 Fig. 1